



TITLE:

細胞性粘菌におけるマクロシスト
形成の調節機構(Dissertation_全文
)

AUTHOR(S):

雨貝, 愛子

CITATION:

雨貝, 愛子. 細胞性粘菌におけるマクロシスト形成の調節機構. 京都大学
, 1984, 理学博士

ISSUE DATE:

1984-11-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k3201>

RIGHT:

學位申請論文

雨貝愛子

学 位 審 査 報 告

氏 名	雨 貝 愛 子
学 位 の 種 類	理 学 博 士
学 位 記 番 号	理 博 第 号
学 位 授 与 の 日 付	昭 和 年 月 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 5 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	理 学 研 究 科 植 物 学 専 攻
(学 位 論 文 題 目) 細胞性粘菌におけるマクロシスト形成の調節機構	
論 文 調 査 委 員	主 査 竹 内 郁 夫 辻 英 夫, 皆 川 貞 一

理 学 研 究 科

(論文内容の要旨)

細胞性粘菌の発生においては、子実体を形成する無性生殖の過程とマクロシストを形成する有性生殖の過程が存在することが知られている。いずれの過程においても、細胞は分裂・増殖したのちに集合体を形成するが、その段階で発生経路の分岐がおこる。集合体がいずれの発生経路をとるかは外的環境に依存しており、水中や暗条件下ではマクロシストが形成されるのに対して、培地上や明条件下では子実体が形成される。一方、明条件下でもマクロシストを形成する突然変異株が単離されている。

申請者は、集合体がいかなる機構によって子実体形成とマクロシスト形成のいずれの発生経路を選択するかについて、野生型と突然変異株を用いて調べた。従来から、暗条件下でも活性炭や流動パラフィンが存在すると子実体が形成されることから、マクロシスト形成を誘導する揮発性物質が集合体から放出されていることが示唆されていた。この物質の作用を調べるために、突然変異株細胞を種々の細胞密度で培養した結果、高細胞密度ではマクロシストが形成されるのに対して、低細胞密度では子実体が形成された。しかし、低細胞密度の細胞に高細胞密度細胞を空気層を隔てて共存させると、マクロシストが形成される。この場合、後者は野生型および突然変異株のいずれの場合にも有効である。これらの事実は、野生型も突然変異株もともに誘導物質を放出していること、およびこの物質の濃度がある程度以上になると突然変異株ではマクロシストが形成されることを示している。

この誘導物質が脂溶性で二酸化炭素と拮抗的に作用することから、申請者はこの物質がエチレンであろうと推測した。そこで、エチレンなどのオレフィン属を吸収する過塩素酸水銀の影響を調べた結果、突然変異株細胞においてマクロシスト形成が阻害され、子実体が形成された。また、エチレン生合成系の阻害剤であるアミノオキシ酢酸存在下でも子実体が形成さ

れた。さらに、誘導物質の濃度が低く子実体が形成される条件下においても、エチレンを外部から添加するとマクロシストが形成された。最後に、野生型および突然変異株についてエチレンの産生能を調べた結果、両者ともエチレンを産生していること、およびその産生能には両者間に差がないことが明らかにされた。これらの結果から、粘菌細胞から放出される揮発性のマクロシスト形成誘導物質はエチレンであることが結論された。

野生型においては上記誘導物質が突然変異株細胞と同程度に産生・放出されているにもかかわらず、明条件下でマクロシストを形成しない。この事実から、申請者は野生型細胞にはエチレンのマクロシスト形成誘導作用を阻害する物質が存在すると考えて、両株の細胞を混合発生させた結果、突然変異株細胞のマクロシスト形成が野生型細胞によって阻害され、子実体が形成されることがわかった。さらに突然変異株細胞を高濃度のサイクリックAMPを含む培地上で発生させると、子実体が形成された。この事実は、サイクリックAMPがエチレンと拮抗的にはたらき、細胞内における両者のバランスが子実体形成とマクロシスト形成の発生経路の選択に関係する可能性を示唆している。

(論文審査の結果の要旨)

生物の生殖過程には有性生殖と無性生殖の過程があり、個体がいずれの過程をいかなる機構によって選択するかは生物学上の重要な問題であるが、不明の点が多い。細胞性粘菌の場合には、無性生殖過程は子実体を形成する発生経路であり、有性生殖過程はマクロシストを形成する発生経路である。両過程は分裂・増殖した細胞が集合体を形成する段階で分岐する。集合体がいずれの発生経路をたどるかは環境条件に依存し、水中や暗条件下ではマクロシストが形成され、培地上および明条件下では子実体が形成される。一方、このような条件下でもマクロシストを形成する突然変異株が単離されている。

本研究は、野生型および上記突然変異株を用いて、子実体とマクロシストへの発生経路の選択がいかなる機構によって調節されるかを明らかにしようとしたものである。従来から、マクロシスト形成が誘導される条件下でも、活性炭や流動パラフィン存在下では子実体が形成されることから、細胞はマクロシスト形成を誘導する揮発性物質を放出していることが示唆されていた。申請者は、この物質の生物的作用を調べるために、野生型と突然変異株細胞を種々の条件下で単独あるいは共存して発生させた結果、両株はともに誘導物質を生産・放出していること、およびこの物質の濃度がある程度以上になるとマクロシスト形成が誘導されることを明らかにした。

マクロシスト形成誘導物質の化学的・生理的諸性質から、申請者はこれがエチレンであることを推測し、それを確認するための種々の実験を行った。その結果、①エチレンを吸収する化学物質の存在下ではマクロシスト形成が阻害される。②細胞におけるエチレンの生合成を阻害するとマクロシスト形成が阻害される。③外部からエチレンを添加するとマクロシスト形成が促進される。④野生型と突然変異株はともにエチレンを生産・放出

している。これらの結果は、細胞性粘菌における有性生殖過程であるマクロシスト形成誘導物質がエチレンであることを明確に示したものとして高く評価される。また、この発見は、高等植物において多様な発生過程の制御に関係している物質が高等植物以外の発生系においても機能していることを初めて示したものとして、きわめて意義深い。

申請者はさらに、野生型細胞がエチレンを十分生産しながらマクロシストを形成しない事実に着目して、エチレンに拮抗する第二の調節物質の存在を推測し、これがサイクリックAMPであるとする可能性を示唆した。サイクリックAMPは子実体形成経路の発生に大きな役割を果たしていることが知られており、この意味でもエチレンとサイクリックAMPの量的バランスによって無性生殖と有性生殖の分岐が調節されるという申請者の説は、今後のこの方面の研究の発展に大きな指針を与えるものとして高く評価される。

参考論文は細胞性粘菌における細胞分化とパターン形成に関したもので、いずれも申請者の優れた研究能力を示すものである。

よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。

細胞性粘菌におけるマクロシスト 形成の調節機構

京都大学理学部植物学教室

雨 貝 愛 子

要 旨

細胞性粘菌 Dictyostelium mucoroides

No. 7 と 8 の突然変異株は、子実体を形成する無性生殖過程の他に、マクロシストを形成する有性生殖過程をもつ。両株において、子実体を形成するか、マクロシストを形成するかは外的環境に依存して、集合塊形成の時期に決定される。水中や暗条件においてはマクロシストが形成されるが、活性炭存在下やミラールオイル中では子実体が形成される。又野生株では明条件で子実体が形成されるが、突然変異株ではマクロシストが形成される。活性炭存在下で子実体が形成されることから、活性炭に吸着される揮発性物質がマクロシスト形成の誘導に関与していることが示唆されている (Weinkauff, A.M. and Filosa, M.F., 1965. Filosa, M.F. and Rengler, R.E., 1972. Filosa, M.F., 1979)。

突然変異株細胞を寒天上、明条件下で発生させると、高細胞密度ではマクロコロニーが、低細胞密度では子実体が形成された。しかし、低細胞密度の細胞に高細胞密度の細胞から出される揮発性物質を与えるとマクロコロニーが形成された。これらのことから、突然変異株においてマクロコロニー形成は揮発性物質がある閾値以上に存在する場合に誘導されることが結論された。突然変異株は pH 7.8 でマクロコロニーを形成するが、pH 5.6 では主に子実体を形成したので、この物質は塩基性である可能性が考えられる。しかし、細胞性粘菌のモルフォゲンの一つとして知られているアモニニアはマクロコロニー形成に影響しなかった。

揮発性物質が脂溶性で、二酸化炭素と対立的に働くことから、マクロコロニー形成におけるエチレンの役割について検討した。まず、エチレンなどのオレフィン属を特異的に吸着する過塩素酸水銀存在下では、突然変異株

細胞は子実体を形成した。又、エチレニのア
ンタゴニストである二酸化炭素ガスを添加し
た場合にも、子実体が形成された。エチレン
合成系の阻害剤であるアミノオキシ酢酸存在
下でも子実体が形成された。もう一つの阻害
剤であるアミノエトキシビニルグリシンは高
濃度でマクロニスト形成を抑制したが、子実
体は形成されなかった。さらにエチレニカス
を添加すると、突然変異株細胞はマクロニス
トを形成した。野生株および突然変異株細胞
がエチレニを放出していることがガスフロマ
トグラフによって確かめられた。これらの
結果から、マクロニスト形成を誘導する揮発
性物質はエチレニであると結論された。

野生株細胞は揮発性物質を少量放出して
いるにもかかわらず、寒天と明条件下では子
実体を形成する。突然変異株細胞も野生株細
胞と混合して発生させると子実体を形成した。
このことは、野生株細胞は揮発性物質のほた
らきを阻害する物質を産生していることを示

唆している。集合期の突然変異株細胞に 1mM サイクリックAMP を与えると子実体が形成されたので、サイクリックAMP がエチレンとアブジブスチックに働いている可能性が考えられる。

以上の事実に基づいて、野生株および突然変異株細胞が子実体とマクロニストのいずれの方向に発生するかはエチレンとサイクリックAMP の量的バランスによって決定される可能性について論議した。

目 次

序 論	3
材料と方法	6
Ⅰ 材料	6
Ⅱ 培養条件	6
Ⅲ ガスの添加法	
1) エチレニガス	7
2) 二酸化炭素	8
Ⅳ ガスクロマトグラフィによる エチレンの検出	9
Ⅴ 薬品類	10
結 果	
Ⅰ マクロシストを誘導する揮発性 物質	11
1) 発生の方が決定される時期	11
2) 揮発性物質の作用機構	11
3) 揮発性物質の同定	
A. pHの発生への影響	17

B. アニモニアの発生への影響 ^D	17
C. エチレニの発生への影響 ^D	21
a) エチレニの除去	23
b) エチレニの添加	24
c) 細胞からのエチレニの検出	28
d) エチレニ合成系の阻害剤の影響 ^D	29
e) エチレニのアンタゴニスト としての二酸化炭素の影響 ^D	31
II. 子実体で誘導する物質	
1) 野性株による子実体形成を誘導 する物質の産生	35
2) サイクリックAMPの子実体形 成誘導作用	38
考 察	39
文 献	48
謝 辞	50

序 論

細胞性粘菌はバクテリアを餌として増殖する。餌がなくなると、増殖したアムーバは集合して移動体と呼ばれるナメカジ状の多細胞体を形成して移動する。一定時間移動した後、移動体は胞子塊とそれを支える柄かくなる子実体を形成する。餌が存在すると胞子は発芽して再び生活史がくり返される (Bonner, 1967)。

細胞性粘菌 Dictyostelium mucoroides No. 7 (Dm 7) は子実体を形成する他に、子実体とはまったく発生形態の異なるマクロシストを形成する (Blaskovics and Raper, 1957)。マクロシスト形成は大きな集合塊の形成ではじまる。集合塊は precyst と呼ばれる小さな細胞塊に細分し、繊維状の物質から成る厚い膜で囲まれる。precyst の中心には大きな lytrophagic cell (giant cell) が現われ、周囲の細胞をとりこんで、ついに

一つの大きな細胞になる。周囲の細胞がすべてとりこまれると(とりこまれた細胞を *endocytos* とよぶ), *cytrophagic cell* の周囲にさらに厚い二次膜が形成される。ついで *endocytos* はこわれて顆粒状になり, マクロシストが完成する (Filosa, et al 1972)。マクロシスト形成はその過程で *diploid* 形成を含む有性生殖過程であると考えられている (MacInnes, M. A. and Francis, D., 1974)。

Dm7 の細胞が子実体を形成するかマクロシストを形成するかは外的環境を変えることにより調節することができるといえる。水中においては常にマクロシストが形成される (Filosa, M. F. and Dengler, R. E., 1972)。しかし寒天上で発生させると, 光によって発生経路が影響され, 明条件下では子実体が形成されるが, 暗条件下ではマクロシストが形成される (Weinkauff, A. M. and Filosa, M. F., 1965)。しかし KOH 存在下では, 明条件下でもマクロシストが形成される (Filosa,

M. F., 1979)。又、活性炭存在下やミネラルオイル中では暗条件下でも子実体が形成される。活性炭存在下で子実体が形成されるのは、マクロシスト形成を誘導する揮発性物質が活性炭によって除去されるためと考えられている (Weinkauff, A. M. and Filosa, M. F., 1965)。

Dm 7 から分離された突然変異株は、野生株と異なり、暗黒下のみならず光照射条件下にもマクロシストを形成する。しかし、他の条件においては野生株と同様の反応を示し、水中ではマクロシストを、活性炭存在下やミネラルオイル中では子実体を形成する。

以上のように、寒天上で光照射しながら発生させると、野生株は子実体を、突然変異株はマクロシストを形成する。すなわち、両株は同一条件下で全く異なる発生経路を示す。本研究では、同一条件下におかれた両株の発生を比較することによって、子実体形成とマクロシスト形成への発生を調節している機構

について検討し、調節に関与する物質とその作用を明らかにした。

材料と方法

I. 材料

細胞性粘菌 Dictyostelium mucoroides
No. 7 とそれから分離された突然変異株を本
研究に用いた。餌としては Escherichia coli
を用いた。

II. 培養条件

突然変異株の胞子は細胞と活性炭存在
下に発生させることによって得られた (Filosa,
1979)。野生株あるいは突然変異株の胞子を
バクテリアと滅菌水中で混合して、その 0.15
ml を栄養培地 (ハプトン 10g, グルコース
10g, Na_2HPO_4 0.96g, KH_2PO_4 1.45g,
寒天 20g, 水 1000 ml) (Bonner, 1967)
上にガラス棒によって均一に広げて 22°C,

光照射の条件下で発生させる。24時間後に増殖中の成長期の細胞を集めて、バクテリア懸濁液 (20 mM リン酸緩衝液 pH 6.2 にバクテリアを懸濁したものを) (Gerisch, 1960) 中で21時間振盪培養した。成長期で細胞を集めて標準塩溶液 (NaCl 0.6g, KCl 0.75g, CaCl₂ 0.3g, 水 100 ml) (Bonner, 1947) で3回洗浄し、洗浄後、同液に懸濁する。1 ml の細胞懸濁液を直径 3 cm のガラスペトリ皿の寒天 2 ml 上に置き、細胞が底質に接着するまで30分間静置したのち、余分の水をとり除き、寒天表面を暫時乾燥させた。発生は光照射条件下、22°Cで密封して行なった。観察は48時間後に実体顕微鏡で行なった。

Ⅲ ガスの添加法

1) エチレンガス：細胞のおかれていた寒天の入った直径 3 cm のガラスペトリ皿を直径 9 cm のガラス皿の中に入れて同じ大きさのガラスペトリ皿でふたをする (容積：

250 cm^3)。5 ml のガラス製の注射器を用いて、向い合わせられたガラス皿間の隙間から空気によって100分の1に希釈したエーレンガス(日本クロマト工業)3 ml をガラス容器中に注入した。ガス注入後すぐにビニールテープで密封した。エーレンガスは水にとけにくいので、ガスもれを少なくするために、ガラス皿をさらにパラフィルムで包み水中に沈めて培養した。コントロールの細胞はガス注入する操作は行わずに他の操作は同様にして培養した。

2) 二酸化炭素：この場合に限って、容器は直径4 cm のガラスペトリ皿のふたを用いて、その中の2 ml 寒天上に細胞を置いた。同じ大きさの皿のふちに、熱した金属棒によって小さなくぼみを作ったものを細胞の置かれているガラス皿の上にかぶせてビニールテープで密封した(容積：30 cm^3)。ふたの小さなくぼみによってできる両皿間の隙間に5 ml ガラス製の注射器の針をつきさし、

100%ニ酸化炭素(西尾工業) 3ml を注入する。注入後、針によって作られた穴をすばやくビニールテープで塞いで培養した。

IV. ガスクロマトグラフィーによる エチレンの検出

細胞から放出されるエチレンガスの検出のために、野生株あるいは突然変異株の細胞を適当な細胞密度で 1ml の標準塩溶液中に懸濁し、20ml エレンマイヤー中に入れた。エレンマイヤーの口をシリコン栓でしっかりとふたをして、暗条件、100 rpm で振盪した。48時間後に 5ml のガラス製の注射器の針をシリコン栓につきさして 2ml のガスを採集して、ガスクロマトグラフィーにかけた。コントロールには細胞を含まない標準塩溶液 1ml の入ったエレンマイヤーを用いた。エチレンガスの測定は今回の方を少し変えたガスクロマトグラフィーによって行なった(Imaseki, 1968)。ガスクロマトグラフィー

には島津のGC 7A型を用い、長さ 3-1 m、内径 3.2 mm のガラス製のコラムに活性アルミナ (60~80 mesh, 西尾工業) を詰め、キャリアガスのヘリウムを 50 ml/分の速さで流して、75°C で測定を行なった。細胞から出されているエーレン量 は測定値から空気中に含まれているエーレン量を差し引くことによつて求められた。

V. 薬品類

本研究で使用された薬品の中で、アミノキシ酢酸とサイクリック AMP はシグマケミカルのもので使用した。アミノエトキシビニルグリシンは Dr. Stempel, Research Division, Hoffmann-LaRoche, Nutley, N. J., U S A によつておくられたものを使用した。

結 果

I. マクロシストを誘導する揮発性物質

1) 発生の方向が決定される時期

突然変異株を光照射して寒天上で発生させると、マクロシストが形成される。しかし、活性炭存在下では子実体が形成される。この事実が活性炭で除去される揮発性物質がマクロシスト形成に関与していることを示唆している。そこで、いろいろな発生時期に活性炭と共存させることによって、どの発生段階で発生の方向が決定されるかを調べた。その結果、集合塊形成の時期までに活性炭と共存させると子実体が形成されることがわかった。この時期以降では活性炭と共存させても、マクロシストが形成された。したがって、子実体あるいはマクロシストへの発生方向は集合塊形成の時期に決定される。

2) 揮発性物質の作用機構

マクロシストを誘導する揮発性物質が存在

することはすでに知られているが、揮発性物質がどのようにマクロシストを誘導するかはわかっていないので、これについて調べた。

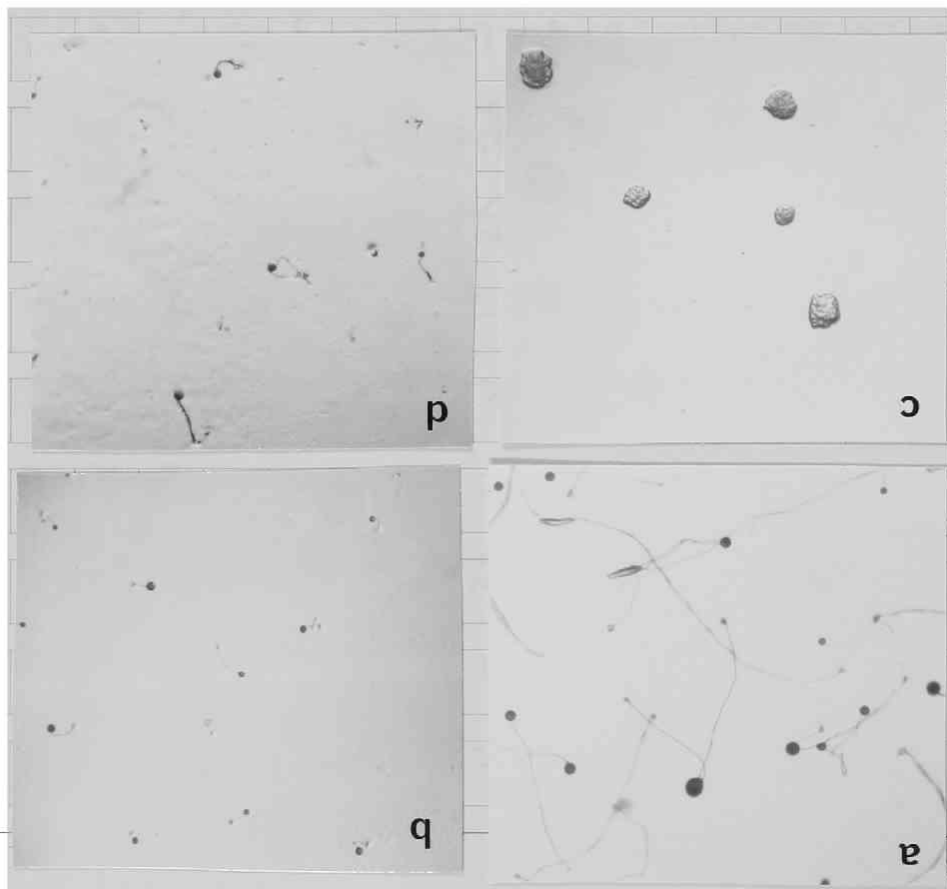
突然変異株を高細胞密度で直径3cmのガラス皿内の塞天上で発生させるとマクロシストが形成されるが、同様のガラス皿を直径9cmのガラス容器(容積: 250 cm^3)の中に移して発生させると子実体が形成された。この事実は大きな容器中では揮発性物質の濃度が減少したためであると考えられ、揮発性物質はある閾値以上でマクロシスト形成を誘導すると結論される。

個々の細胞から放出される揮発性物質の量がほぼ同じであるならば、一定容積内の揮発性物質の量は細胞数に依存して変化すると考えられる。したがって、細胞密度がマクロシスト形成に影響を及ぼす可能性が考えられるので、これについて検討した。しかし、野生株では細胞密度の影響は見られず、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$ 細胞/ cm^2 の範囲ですべて子実体が形

成された。これに対して突然変異株では、 1×10^6 細胞/cm² 以上の細胞密度ではマフロニストが形成され、 3×10^5 細胞/cm² 以下では子実体が形成された (下, g. 1)。その中間の細胞密度では未分化の集合塊と子実体が共存していたが、細胞密度が小さくなるほど未分化の細胞塊数に対する子実体数が増加した。

突然変異株において低細胞密度で子実体が形成されるのは、揮発性物質が閾値以上に蓄積しなかったためであると考えられる。そこで、低細胞密度の細胞に充分量の揮発性物質を外部から補給することによってマフロニストが形成されるかどうか調べた。低細胞密度の野性株あるいは突然変異株の細胞が置かれたガラス皿を高細胞密度の野性株や突然変異株の細胞が置かれたガラス皿といろいろのくみ合わせて向かい合わせ、ビニールテープで密封して発生させた。低細胞密度の突然変異株の細胞は、それ単独の場合あるいは低細胞密度の野性株や突然変異株の細胞とくみ合わせ

Fig. 1. 細胞密度の発生への影響



成長期。野性株と突然変異株を1:3の
細胞密度で2ml 量天にまいて、22°C, 明
条件で48時間発生させる。倍率: 15倍

a, 細胞密度 2×10^6 細胞/cm² の野性株細胞

に50%形成された子実体, b: 細胞密度

2×10^5 細胞/cm² の野性株に50%形成された

子実体, c: 細胞密度 2×10^6 細胞/cm² の突然

変異株細胞に50%形成された70%以上,

d: 細胞密度 2×10^5 細胞/cm² の突然変異株細胞

形成した子実体

せて発生させた場合には子実体を形成した。しかし、高細胞密度の野生株や突然変異株とくみ合わせて発生させるとマクロシストを形成した (Table 1)。このことは揮発性物質を補給することによって低細胞密度の細胞でもマクロシストを形成することを示している。又この結果は、野生株細胞が子実体を形成する場合でも揮発性物質を充分量放出していることを示している。したがって、野生株でマクロシストが形成されないのは揮発性物質が閾値以上に合成されないからではなく、他の要因が関係していると考えられる。実際に、低細胞密度の野生株の細胞と高細胞密度の野生株や突然変異株とくみ合わせても、突然変異株のようにマクロシスト形成が誘導されなかった。また、この場合に非集合の細胞が多くみられたことは、揮発性物質が集合に関与していることを示唆している。

Cells on lower dish	The final developmental form of cells on upper dish	
	Mutant cells (2×10^5 cells/cm ²)	Dm-7 cells (2×10^5 cell/cm ²)
no cell	fruiting bodies	fruiting bodies
low cell density (2×10^5 cell/cm ²)		
wild type cells	fruiting bodies	fruiting bodies
mutant cells	fruiting bodies	fruiting bodies
high cell density (2×10^6 cells/cm ²)		
wild type cells	macrocyts	unaggregated cells and fruiting bodies (few macrocyts)
mutant cells	macrocyts	unaggregated cells and fruiting bodies (few macrocyts)

Table 1: 野性株と突然変異株から放出される揮発性物質の両株の発生への影響

細胞のまかれていた寒天の入ったガラス皿をいろいろ組み合わせでビニールテープで封して、22℃、明条件で発生させる。48時間後に、上のガラス皿の低細胞密度の細胞の発生形態を实体顕微鏡で観察した。

3) 揮発性物質の同定

A. pHの発生への影響

まず揮発性物質が酸性か塩基性のどちらで働いているかを知らるために、pH 5から9までのいろいろな種類の緩衝液を含む密封上で細胞を発生させた。緩衝液には20 mM リン酸緩衝液、20 mM MES 緩衝液と50 mM トリス緩衝液を使用したか、結果は用いられた緩衝液の種類によつては影響されなかった。野生株ではすべてのpHにおいて子実体が形成された。突然変異株ではpH 7.8でマクロシストが形成されたが、pH 5では子実体が形成された。pH 6では子実体と未分化の細胞塊が形成された(図2)。

B. アンモニアの発生への影響

突然変異株では高いpHにおいてのみマクロシストが形成されることから、揮発性物質は塩基性である可能性が考えられる。よつて細胞性粘菌の集合、分化に影響することが知られている塩基性の揮発性物質である

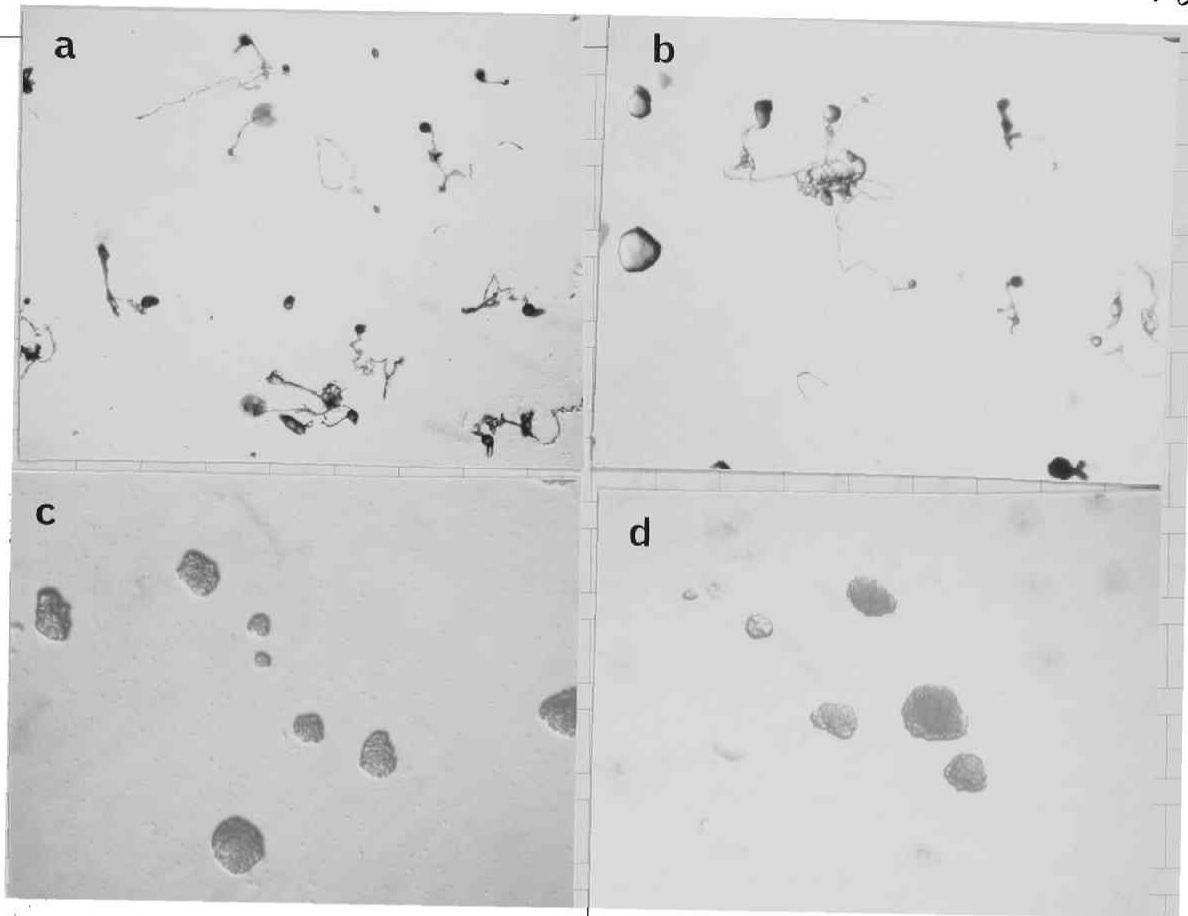


Fig. 2: 突然変異株の発生への pH の影響

成長期の突然変異株細胞をいろいろな pH の 20 mM MES 緩衝液を含む寒天 2ml 上にまいて, 22°C, 明条件で 48 時間発生させる。細胞密度: 2×10^6 細胞/cm², 倍率: 20 倍。

a: pH 5 で形成された子実体, b: pH 6 で形成された子実体と未分化の細胞塊, c: pH 7 で形成されたマクロニスト, d: pH 8 で形成されたマクロニスト。

アンモニアがマクロシスト形成を誘導するかどうかを検討した (Thadani, et al, 1977, Sussman, 1978)。

成長期終了直後の細胞をまいた直径3cmのガラス皿を1mlの1N NaOH と1mlの1/3 いる濃度の NH_4Cl の混合液の入った同じ大きさのガラス皿の上に、溶液混合後すぐにかぶせて、ビニールテープで密封して発生させた (Thadani, et al, 1977)。その結果、低濃度のアンモニアガスは野性株細胞の発生には影響を与えなかった。高濃度のアンモニアガスの場合には野性株 突然変異株とも集合できなかった。又突然変異株の細胞は NH_4Cl を含まない NaOH のみのコントロールの場合に、マクロシスト形成を precyst の段階で停止した。これは NaOH で吸収される物質、たとえば二酸化炭素や水などが発生の継続に必要であることを示唆している (Table 2)。

次に、集合期の細胞へのアンモニアガスの影響について調べた。結果は基本的には成長

NH ₄ Cl (mM)	Final developmental pattern			
	Dm-7 cells		Mutant cells	
	low cell density	high cell density	low cell density	high cell density
0				
0.25	fruiting bodies	fruiting bodies	fruiting bodies	aggregates subdivided into precysts
0.5				
0.75	no aggregation	fruiting bodies	no aggregation	no aggregation
1	no aggregation	no aggregation	no aggregation	no aggregation

Table 2. 野性株と突然変異株の成長期の細胞へのアンモニアカスの影響

成長期の Dm7 が突然変異株の細胞のまかれて
 いるガラス皿を 1N NaOH /ml と 1/3 1/3
 の濃度の NH₄Cl 2/ml 混合した液の入った
 同じ大きさのガラス皿にかぶせて、ビニール
 テープで封をして 22°C, 明条件で 48 時間発生
 させる。低細胞密度 2×10^5 細胞/cm²,
 高細胞密度 2×10^6 細胞/cm².

期の細胞と同じであ、たが、高濃度のアンモニアガスは野性株の子実体形成に影響を与え、胞子塊の小さな子実体が形成された。又液胞化した細胞からなる細胞塊も見られた。突然変異株では大きな細胞塊を構成している細胞がやはり液胞化していた (Table 3)。アンモニアがマクロシストを誘導する揮発性物質であるならば、少くとも低細胞密度の突然変異株の細胞はアンモニアによってマクロシストを形成するはずだが、それは見られなかった。このことからアンモニアがマクロシストを誘導する揮発性物質である可能性は否定された。

C. エタレンの発生への影響

野性株と突然変異株の細胞はともに水中ではマクロシストを形成し、ミネラルオイル中では子実体を形成することから、マクロシスト形成に関与している揮発性物質は脂溶性であると思われる。又 KOH によって二酸化炭素を除くことによって野性株の細胞は光条件下でマクロシストを形成する (Filosa, 1979)

ので、二酸化炭素とアンタゴスティックに作用すると考えられる。これらのことから、この物質はエチレンに似た性質をもっていると思われる。そこで揮発性物質がエチレンであるかどうかをいくつかの方法を用いて検討した。寒天上で光照射した場合、突然変異株の発生形態は揮発性物質の濃度のみによって調節される(前述)ので、この実験には主に突然変異株の細胞を用いた。

A) エチレンの除去: まず、エチレンなどのオレフィン属を特異的に吸着する過塩素酸水銀 ($0.25 \text{ M HgO in } 2 \text{ N HClO}_4$) (Young et al., 1952) /ml の入ったガラス皿に突然変異株細胞を高細胞密度で置いたガラス皿をかぶせて封をして発生させた。コントロールは水銀を含まない 2 N 過塩素酸 /ml と共存させて発生させた。結果は、過塩素酸水銀と共存させた場合は子実体が形成され、過塩素酸と共存させた場合はマクロシストが形成された。コントロールでは又、集合塊で発生が停

止したり、マクロシスト形成が遅れたりした。これは強酸である過塩素酸に塩基性物質が吸収されることにより、細胞周辺のpHが下がり、マクロシストが形成されにくくなるためではないかと考えられる。又強酸による水分の吸収もマクロシスト形成には不利な条件である。しかし、過塩素酸水銀によるアルミニウムの除去がマクロシスト形成を阻害し、子実体形成を誘導したことはエーレンが細胞性粘菌の発生に関与している可能性を強く示唆している (Fig. 3)。

b) エーレンガスの添加：次にエーレンガス存在下で細胞を発生させてエーレンガスの発生への影響について調べた。前述したように大きな容器中で発生させると、揮発性物質が閾値以下になり、マクロシスト形成が阻害され、子実体が形成されるので、大きな容器のなかで細胞を発生させる条件下でエーレンガスを加えた。その結果、コントロールでは子実体が形成され、最終濃度/100

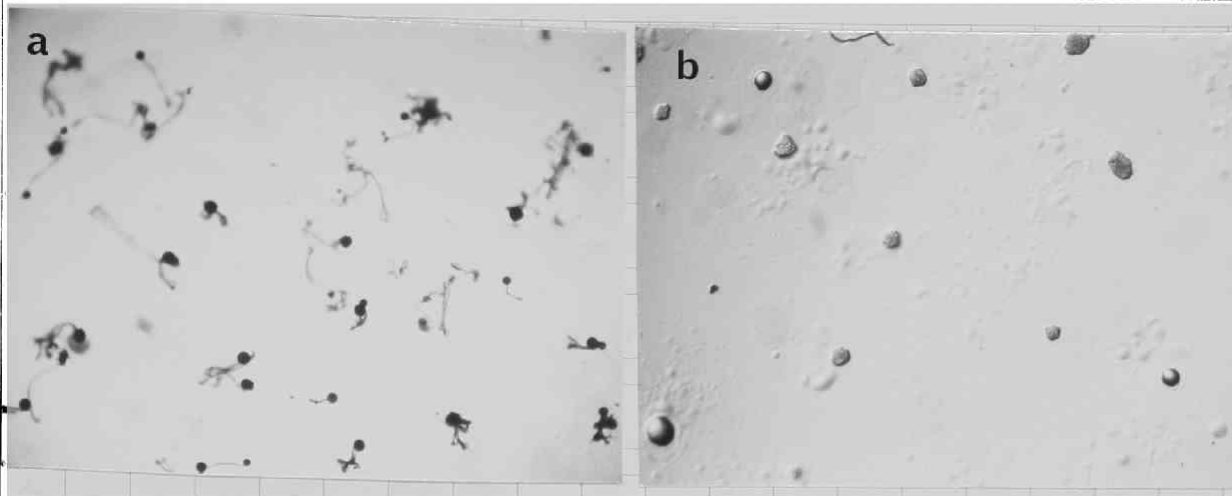


Fig. 3: 突然変異株細胞の発生への
エチレン除去の影響

成長期 α 突然変異株細胞を 2×10^6 細胞/cm² の細胞密度で置かれた寒天 2ml を含むガラス皿と、過塩素酸水銀 (0.25M HgO in 2N HClO₄) 1ml が 2N 過塩素酸 1ml を含む同じ大きさのガラス皿の上にかぶせてビニールテープで密封して、22°C 明条件で 48 時間発生させた。倍率: 20 倍

a: 過塩素酸水銀存在下で形成された子実体, b: コントロールとして, 水銀を含まない過塩素酸存在下で形成されたマクロシストと未分化の集合塊

ppm のエチレンジオキサイドを加えた場合にはマクロフィストが形成された (Table 4)。しかし、この実験では結果が安定でなく、集合塊で発生が停止している場合がコントロールでもエチレンジオキサイドを加えた場合でも見られた。しかし、この場合でも両者の結果に差がないわけではなく、コントロールが集合塊の場合、エチレンジオキサイドを加えた方はマクロフィストであり、コントロールが子実体の場合、エチレンジオキサイドを加えた方が集合塊という組み合わせであったので、エチレンジオキサイドは明らかに発生に影響を及ぼしていることがわかる。又、エチレンジオキサイドの影響は細胞密度によって異なっており、細胞密度が低い場合にはエチレンジオキサイドがマクロフィストを誘導しないで細胞塊で発生が停止した場合が多かった。これは発生の進行に必要な物質の濃度が細胞密度が低くなることにより低下するためではないかと考えられる。又、加えられたエチレンジオキサイドの濃度は通常の生理活性を示す濃度と比べて非常に高いが、最終濃度 1 ppm のエチレンジオキサイドでも

Table 4: The effects of authentic ethylene addition on the mutant cells derived from *D. mucoroides* no.7

Cell density (cells/cm ²)	exp. cases	ethylene (100 ppm)	macrocyts (%)	aggregates (%)	fruiting bodies(%)
2×10^5	3	+	33	66	0
		-	0	0	100
1×10^6	4	+	25	75	0
		-	0	0	100
2×10^6	7	+	86	14	0
		-	0	29	71

突然変異株の細胞をまいた直径3cmのガラス皿を直径9cmのガラス皿に入れて、同じ大きさのガラス皿でふたをする。合わせて2つのガラス皿の隙間から空気で1%に希釈したエチレンガスを3ml添加し、ビニールテープで封をする。さらに全体をパラフィルムで包み、水中にしずめて、22°C、明条件で48時間発生させる。表中の数字はそれぞれの発生形態を示した実験数のパーセントを表わしている。

同様の結果が得られた。このことから、エチレンによるマクロシスト誘導は高濃度のエチレンガスによる非生理的な影響によるのではない。

（c）細胞からのエチレンの放出：
エチレンを添加した実験によって、エチレンがマクロシストを誘導することが明らかになったが、実際に野生株と突然変異株の細胞がエチレンを産生しているかどうかをガスクロマトグラフィーを用いて調べた。エチレンは微量で作用し、細胞の合成するエチレン量も微量と考えられるので、大量の細胞を扱うことのできる液体培養をエチレンの測定に用いた。細胞懸濁液を 100 r.p.m でゆすり振盪すると、24時間で集合塊ができ、48時間では *enolocytes* をもつマクロシストが形成された。エチレンは24時間後の培養で検出された。48時間後には24時間よりわずかに増加しているが、著しい増加はみられなかった。エチレンの合成量は野生株、突然変異株ともほぼ同量

であった (Table 5)。以上の結果より、エケレンが細胞によつて実際に産生されていることが明らかになった。

α) エケレン合成系の阻害剤の影響: アミノオキシ酢酸 (AOA) とアミノイソチン (AVG) はエケレン合成系の阻害剤として知られている (Boller, 1979, Amrhein et al. 1979) ので、これらの影響について調べた。まず、20 mM の MES 緩衝液 (pH 7.0) を含む 1 ml の寒天上に高細胞密度で突然変異株細胞をまいて、細胞を寒天上に接着させてから余分な水をとり暫時乾燥させる。それを 20 mM MES 緩衝液と先の阻害剤をいろいろの濃度で含む 1 ml の寒天上に重ねて発生させた。AOA については最終濃度が $5 \times 10^{-4} M$ でマクロシスト形成が阻害され、子実体が形成された。 $1 \times 10^{-3} M$ 以上では、細胞は非集合であった。AVG の場合には AOA よりも高い濃度でマクロシスト形成が阻害された。しかし、この場合に

Cell density (cells/ml)	The amount of ethylene released (ppm)	
	<u>D. mucoroides</u> -7	mutant
1×10^8	2.4×10^{-2}	1.7×10^{-2}
2×10^8	3.3×10^{-2}	3.5×10^{-2}

Table 5: 野性株と突然変異株による
エチレンの放出

1 mlの突然変異株か野性株の細胞懸濁液を
20 ml のエレンマイヤーに入れ、シリコン栓
でふたをして、100 r.p.m. 暗条件で発生さ
せる。48時間後、ガラス製の注射器で2 mlの
ガスをエレンマイヤーからぬき、ガスクロマ
トグラフィーにかける。細胞からエレンマイ
ヤー中に放出されたエチレン量は細胞を含ま
ないコントロール中のエチレン量を差し引い
て補正されている。

は子実体は形成されず、細胞塊の段階で発生が停止した (Table 6)。

e) E4L2 のアンタゴニストとしての二酸化炭素ガスの影響：E4L2 のアンタゴニストとして知られている二酸化炭素の影響について調べた。10% の二酸化炭素を突然変異株 (1×10^6 細胞/cm²) に加えると、マクロニストが形成されずに子実体が形成された。二酸化炭素を加えないコントロールではマクロニストが形成された (Fig. 4: c, d)。

二酸化炭素なしでマクロニストが形成される場合には大きな集合塊が形成されるが、二酸化炭素存在下に子実体が形成される場合には小さな集合塊が形成される (Fig 4: a, b)。この結果は E4L2 が集合塊の大きさにも影響していることを示唆している。

集合塊が形成されてから二酸化炭素を加えると、2時間以内に一つの集合塊から多くの乳頭突起が出現した。このことは、E4L2 が乳頭突起の形成を阻害する作用をもつこと

Table 6: The effects of inhibitors of ethylene synthesis on macrocyst formation

Final concentration of the inhibitor(M)	Final developmental form in the presence of inhibitor	
	AOA	AVG
0	macrocyts	macrocyts
1×10^{-4}	macrocyts	macrocyts
5×10^{-4}	fruiting bodies	macrocyts & aggregates
1×10^{-3}	no aggregates	macrocyts & aggregates
1×10^{-2}	N.D.	aggregates

成長期の突然変異株の細胞のあかれこいる
20 mM MES 緩衝液 (pH 7.0) を含む寒天 1 ml
を、表に記された濃度の 2 倍の濃度の阻害剤
を含む同緩衝液に溶かされた寒天 1 ml 上に重
ねて、22°C、明条件で 48 時間発生させる。
N.D. は実験を行なわなかったことを意味し
ている。

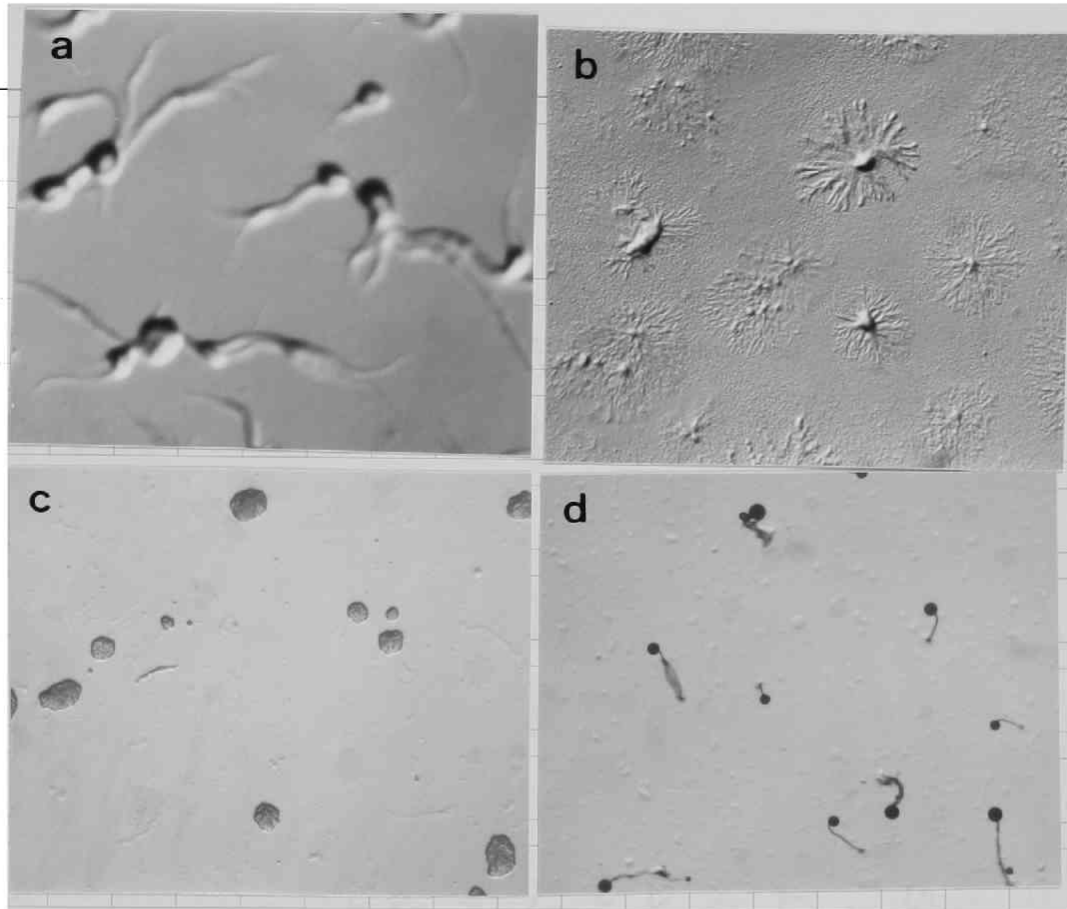


Fig. 4: 突然変異株の集合塊の大きさと
発生への二酸化炭素カスの影響

直径 4 cm のガラス皿中の寒天 2 ml 上に成長期の突然変異株細胞を, 1×10^6 細胞/cm² の細胞密度でまく。そのガラス皿をふたに小さなへこみのある同じ大きさのガラス皿でふたをし、ビニールテープで密封する (体積: 30 cm³)。重ね合わせたガラス皿の間の小さなへこみに注射器の針をさして, 100 % 二酸化炭素 3 ml を注入する。注射器の針によってできた穴は

すばやくビニールテープでふさいで、 22°C 明条件で発生させる。倍率：20倍。

a; 二酸化炭素を添加せずに発生させて、
 10時間後に見られた集合期の形成されつつあ
 る大きな集合塊、b; 10%二酸化炭素を添加
 して発生させて、10時間後に見られた集合期
 の形成されつつある普通の大きさの集合塊、
 c, 二酸化炭素を添加せずに発生させて48時
 間後に形成されたマフリスト、d; 10%
 二酸化炭素を添加して発生させて、24時間後
 に形成された子実体

を示唆している。

さらに、野性株細胞に10%二酸化炭素を添加して暗条件に発生させるとマクロリストと子実体がほぼ同数形成された。二酸化炭素を添加しないコントロールではマクロリストのみが形成された。このことから、E4L-2は突然変異株のみでなく野性株においてマクロリスト形成を誘導する揮発性物質として働いていると思われる。

II, 子實體に誘導する物質

1) 野性株による子実体形成を誘導する物質の産生

野性株の細胞では子実体が形成される時にもマクロシストを形成するに充分量の揮発性物質が放出されている。それにもかかわらずマクロシストは誘導されずに子実体が形成されることは、野性株の細胞からエチレンの影響を打ち消すような物質が産生されていることを示唆している。

野性株と突然変異株の細胞を最終細胞密度を一定 (2×10^6 細胞/cm²) にして、いろいろな割合で混合して発生させた (Table 7)。この結果、両者を 1 : 1 で混合した場合、子実体のみが形成された。寒天上には非集合の細胞が見られないことから、野性株のみならず、突然変異株の細胞も子実体を形成していることを示している。この結果は、エーゼルが発令量産生されている条件下で、野性株から出されている物質によって突然変異株の細胞はマクロリストを形成せず子実体を形成することを示している。野性株に対して突然変異株の混合の割合がさらに増加すると、子実体の他にマクロリストが形成されるようになり、マクロリストの数は突然変異株の細胞数が増加するにしたがって増加する。この結果は、エーゼルと野性株から出されている物質との量的なバランスによって発生の方向が調節されていることを示唆している。

The ratio of Dm-7 cells to mutant cells	1:0	3:1	1:1	1:2	1:4	0:1
The final deve- lopmental form	fruiting bodies	fruiting bodies	fruiting bodies	fruiting bodies and macrocyts	macrocyts and fruiting bodies	macrocyts

Table 7 野性株と突然変異株の混合発生

成長期の野性株と突然変異株の細胞をい
いの割合で混合して, 2ml 寒天上にま
いて, 22°C, 明条件で密封して, 48時間発生さ
せる。

細胞密度はすべての場合に 2×10^6 細胞/cm²。

2) サイクリックAMPの子実体形成誘導作用

マクロシストが形成される時は子実体が形成される時に比べてより大きな細胞塊が形成されることはすでに述べた。このことは、細胞塊の大きさに影響を与える物質に、両者の間で差があることを示唆している。アンモニアとサイクリックAMPの相対量の变化によって集合塊の大きさが調節されていることがThadaniらによって報告されている(1977)。又サイクリックAMPは集合の他に分化にも関与していることが知られている(Bonner 1970, Town 1976, Kay et al 1978)ので、サイクリックAMPがマクロシスト形成にどのような影響を与えているかを調べた。1 mM サイクリックAMPとリン酸緩衝液(pH 7.0)を含む寒天上で細胞を発生させると野生株では小さな子実体が形成され、非集合の細胞も多くみられた。突然変異株ではマクロシストの他に子実体が形成された。

発生の方は集合塊の時期に決定されるので、次に、集合塊の細胞へのサイクリックAMPの影響を調べた。成長期の突然変異株細胞を1mlの蜜天上で集合塊の時期まで発生させてから、2mM サイクリックAMPと40mM リン酸緩衝液(pH 7.0)を含む蜜天1ml上に重ねて、さらに発生させた。その結果は顕著で、突然変異株は子実体のみを形成した(Fig. 5)。この結果から、子実体形成を誘導している物質はサイクリックAMPであると思われる。

考 察

エチレンは植物の成長・分化を調節しているホルモンとして広く知られている(Abeles, E. B. 1973)。エチレンは高等植物の他に、バクテリアや菌類においても産生されていることがすでに知られているが(Freebairn 1964, Ilag, et al 1968)、細胞性真菌 Dictyostelium mucoroides NO. 7 (Dm 7)

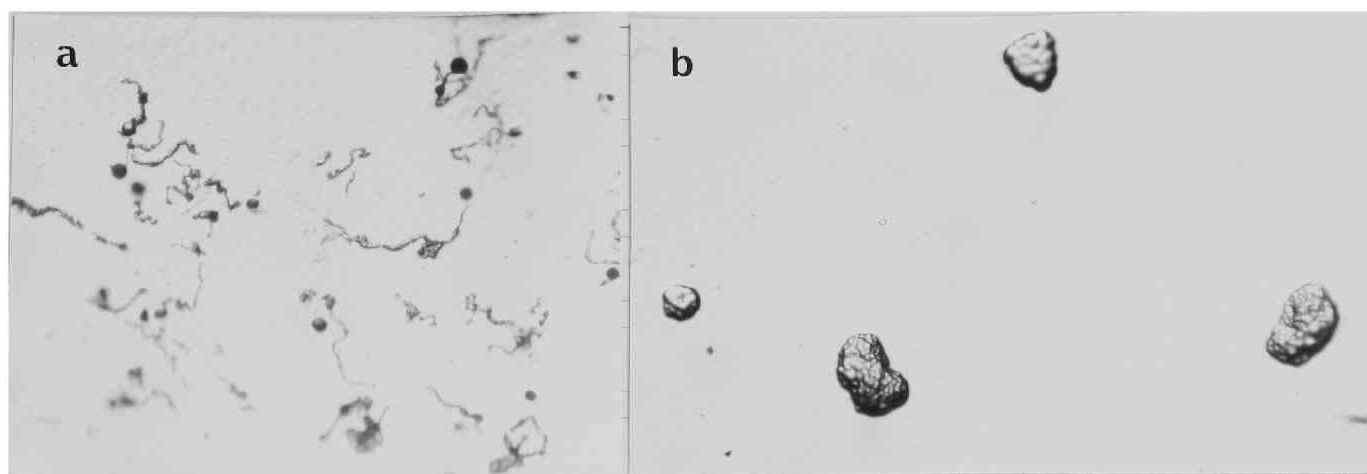


Fig. 5、サイクリックAMPによる突然変異株細胞の子実体形成誘導

成長期の突然変異株を 2×10^6 細胞/ cm^2 の細胞密度で寒天 1ml 上にまいて発生させる。集合塊を形成した時期に、集合塊ののっている寒天を 2mM サイクリックAMP と 40mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) か 40mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) のみを含む寒天 1ml 上に集めて、 22°C 、明条件で 24 時間発生させる。倍率：25倍。

a: サイクリックAMP 存在下で形成された子実体, b: サイクリックAMP を含まない寒天上で形成されたマクドニスト

とくの突然変異株がエチレンを産生していることは本研究によって始めて明らかにされた。又、高等植物以外においてエチレンのはたしている役割については不明であったが、細胞性粘菌においてエチレンがマクロシスト形成に関与していることが明らかにされたことは高等植物以外においても高等植物の場合と同様に分化を誘導するホルモントして働いている可能性が高い。

本研究では、細胞を寒天上で光照射しながら発生させた。この条件では野生株は子実体を形成し、突然変異株はマクロシストを形成した。しかし、野生株は子実体を形成する、この場合においても、マクロシスト形成を誘導するエチレンを産生していることが示唆された。野生株がエチレンを産生しているにもかかわらず、マクロシストを形成しないのは、明条件ではエチレンに対する感受性が変化するという可能性も考えられるが、本研究では

エチレンの他にサイクロリックアムドが発生に関与しているためであることが示唆された。サイクロリックアムドは細胞性粘菌の集合と分化に関与していることがすでに知られている (Konijn 1976, Bonner 1970, Town 1976, Kay et al. 1978) が、発生方向を調節する因子としても働いている可能性が示された。

一方、突然変異株は寒天上、光照射の条件下でマフリエストを形成し、その発生形態はエチレンの濃度によって調節されている。エチレンはある閾値以上で有効となり、低細胞密度や大きな容器中ではエチレン濃度が閾値以下になるために、マフリエストが形成されずに子実体が形成される。エチレンによるマフリエスト形成の誘導は突然変異株によって明らかにされたが、二酸化炭素添加の実験より、野性株においてもエチレンはマフリエスト形成を誘導する揮発性物質として働いていることが示唆されており、野性株においても

突然変異株において、発生の調節は集合塊期におけるエチレンとサイクリックAMPの量的バランスによって説明できると考えられる。つまり、集合塊の形成された時期にエチレンがサイクリックAMPより相対的に多い場合にはマクロニストが形成され、逆にサイクリックAMPがエチレンより多い場合には子実体が形成されると推察される。実際に集合塊形成期において、マクロニスト形成時のサイクリックAMP量が子実体形成時より少ないであろうと推察される報告がある。Thadaniらは、集合塊の大きさをアニモニンとサイクリックAMPの拮抗関係によって説明しており、サイクリックAMP量がアニモニン量より相対的に多い場合は集合塊は小さくなり、サイクリックAMP量がアニモニン量より少ない場合は集合塊が大きくなると報告している(1977)。一方、アニモニンの合成量は子実体形成時とマクロニスト形成時で変わらない(Data not shown)という事実が

ら考えると、大きな集合塊が形成されるマフ
 222スト形成時のサイクリックAMP量は子
 実体形成時より少ないと思われる。実際にマ
 フ222スト形成時と子実体形成時にサイクリ
 ックAMP量に差があるかどうかを明らかに
 するために、細胞内のサイクリックAMPの
 合成量の測定が今後是非とも必要である。

さて、エ4レニとサイクリックAMPは、
 かにして子実体とマフ222ストへの発生を調
 節しているのだろうか。エ4レニのアンタゴ
 ニストである二酸化炭素を集合塊の時期に添
 加すると集合塊から多くの乳頭突起が形成さ
 れる。このことからエ4レニは乳頭突起の形
 成を阻害すると思われる。一方、サイクリッ
 クAMPは移動体の先端で高い (Brenner
 1973) ことから、乳頭突起部で高くあって
 いると推定され乳頭突起の形成を誘導してい
 る可能性が考えられる。このように考えると、
 エ4レニとサイクリックAMPは乳頭突起の
 形成に関して相反する働きをもち、それが子

実体あるいはマフレストへの発生の方向づけに関係しているのではないかとと思われる。

エーレンが細胞の集合過程にも関与している可能性が本研究によって示唆されたが、

Bonnerらはアノモニプには性質の異なる揮発性物質が集合塊の大きさを調節していることを報告している(1963)。この物質はマフレストを誘導する揮発性物質と性質が似ており、実際にマフレスト形成時と子実体形成時には集合塊の大きさがちがうので、

Bonnerの示した集合塊の大きさを調節している物質がエーレンであるかどうかは興味深い問題である。集合塊の大きさを調節している物質は実際は単独ではなく、アノモニプ、サイフリックAMP、揮発性物質と複合の物質が関与している。同様に、マフレスト形成と子実体形成の調節においてもエーレンとサイフリックAMP以外の物質が関与している可能性は否定できない。強酸存在下で発生が集合塊で停止してしまうこと、および大き

な容積のガラス容器中にエチレンを加えた時にも集合塊で発生が停止してしまう場合があることは、エチレンのほかに、強酸によって吸収される塩基性の物質が発生に関与していることを示唆している。このことから、アミノ酸はマクロシストを誘導する働きはもたないが、発生の続行に基本的に必要な物質として関与している可能性は考えられる。

pHがマクロシスト形成に影響していることが明らかにされたが、他の系でも成長・分化の過程でpHの変化が見られることが注目されてきている。細胞性粘菌でもpHの変化が胞子と柄の分化に影響していることが知られている (Gross, et al., 1983)。pHがどのようにマクロシスト形成に関与しているかは不明であるが、高等植物ではエチレンによって膜の透過性が変化することが知られている (Abel, 1973) ので、エチレンが膜の透過性を高めることにより、細胞内のイオン分布が変化して、pHに影響を与えている可能性

も考えられる。

エ４レシとPH, エ４レシとサイクリックAMPがどのように関連しているかを明らかにすることは今後の重要な課題である。又, 細胞性粘菌の発生系は細胞レベルでの解析が可能であるので, 今後のエ４レシの研究系として有用であると思われる。

References

- Abeles, F.B.: Ethylene in Plant Biology, Academic Press, New York, 1973.
- Amrhein, N. & Wenker, D.: Novel inhibitors of ethylene production in higher plants, Plant & Cell Physiol., 20, 8, 1635-1642, 1979.
- Blaskovics, J.C., Raper, K.B.: Encystment stages of Dictyostelium, Biol. Bull., 113, 58-88, 1957.
- Boller, T., Herner, R.C. and Kende, H.: Assay for and enzymatic formation of an ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, Planta, 145, 293-303, 1979.
- Bonner, J.T.: Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum, J. Exp. Zool., 106, 1-26, 1947.
- Bonner, J.T. and Hoffmān, M.E.: Evidence for a substance responsible for the spacing pattern of aggregation and fruiting in the cellular slime molds, J. Embryo. Exp. Morphol., 11, 571-589, 1963.
- Bonner, J.T.: The cellular slime molds, Princeton University Press, New Jersey, 1967.
- Bonner, J.T.: Induction of stalk cell differentiation by cyclic AMP in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 65, 110-113, 1970.
- Brenner, M.: Cyclic AMP levels and turnover during development of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum, Devel. Biol., 64, 210-223, 1978.
- Filosa, M.F. & Dengler, R.E.: Ultrastructure of macrocyst formation in the cellular slime mold, Dictyostelium mucoroides; Extensive phagocytosis of amoebae by a specialized cell, Dev. Biol., 29, 1-16, 1972.
- Filosa, M.F.: Macrocyst formation in the cellular slime mold Dictyostelium mucoroides: Involvement of light and volatile morphogenetic substance(s), J. Exp. Zool., 207, 491-495, 1979.
- Freebairn, H.T. & Buddenhagen, I.W.: Ethylene production by Pseudomonas solanacearum, Nature, 202, 4929, 313-314, 1964.

- Gerisch, G.: Zellfunktionen und Zellfunktionswechsel in der Entwicklung von Dictyostelium discoideum. I. Zellagglutination und Induktion der Fruchtkörperpolarität, Roux Archiv für Entwicklungsmechanik, 152, 632-654, 1960.
- Gross, J.D., Bradbury, J., Kay, R.R. and Peacey, M.J.: Intracellular pH and the control of cell differentiation in Dictyostelium discoideum, Nature, 303, 244-245, 1983.
- Ilag L. & Curtis R.W.: Production of ethylene by fungi, Science, 159, 1357-1358, 1968.
- Imaseki, H., Uritani, I. & Stahman, M.A.: Production of ethylene by injured sweet potato root tissue, Plant & Cell Physiol., 9, 757-768, 1968.
- Kay, R.R., Garrod, D. & Tilly, R.: Requirements for cell differentiation in Dictyostelium discoideum, Nature, 271, 58-60, 1978.
- Macinnes, M.A. & Francis, D.: Meiosis in Dictyostelium mucoroides, Nature, 251, 321-324, 1974.
- Sussman, M., Schindler, J. & Kim, H.: "Sluggers", a new class of morphogenetic mutants of D. discoideum, Exp. Cell Res., 116, 217-227, 1978.
- Thadani, V., Pan, P. & Bonner, J.T.: Complementary effects of ammonia and cAMP on aggregation territory size in the cellular slime mold Dictyostelium mucoroides, Exp. Cell Res., 108, 75-78, 1977.
- Town, C.D., Gross, J.D. & Kay, R.R.: Cell differentiation without morphogenesis in Dictyostelium discoideum, Nature, 262, 717-719, 1976.
- Weinkauff, A.M., & Filosa, M.F.: Factors involved in the formation of macrocysts by the cellular slime mold, Dictyostelium mucoroides, Can. J. Microbiol., 11, 385-387, 1965.

謝 辞

本研究を行なうにあたって、有益な助言と協力をいただいた、Dr. Tilosa, M. F., University of Toronto, Canada, 前田靖男博士，東北大学，今関英雄博士，名古屋大学，竹内郁夫博士をはじめ研究室のみなさまに心から感謝いたします。又、ガスクロマトグラフィーの使用に技術指導をいただいた清水勇博士 出井満氏，京都大学生態研に心から感謝いたします。